

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-203984

(43)Date of publication of application : 08.08.1995

(51)Int.Cl.

C12P 21/00

(21)Application number : 06-007131

(71)Applicant : ENDOU YAETA
ASAHI GLASS CO LTD

(22)Date of filing : 26.01.1994

(72)Inventor : ENDOU YAETA
YOSHINARI SHIGEO
OOBA MASATAKA

(54) SYNTHESIS OF PROTEIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To synthesize a protein by a cell-free protein synthesis system having increased protein synthesis rate.

CONSTITUTION: A protein is synthesized from a gene information in a cell-free protein synthesis system by suppressing the activation of an activity inhibiting factor which is a factor induced by cytoclasis and inhibiting the activity of nucleic acid synthesis and/or protein synthesis.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.09.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3255784

[Date of registration] 30.11.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIP I are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The proteinic synthetic approach characterized by compounding protein from gene information by the cell-free-protein-synthesis system which controlled activation of the activity inhibitor which is activity inhibitor induced in connection with cytolysis, and is a factor which checks the activity of nucleic acid biosynthesis and/or protein synthesis.

[Claim 2] The synthetic approach of claim 1 which is the protein synthesizing system from which the protein synthesizing system which does not contain a cell destroys a cell, and is obtained.

[Claim 3] The synthetic approach of claim 2 that a cell is an animal cell, a plant cell, a fungus cell, or a bacterial cell.

[Claim 4] The synthetic approach of claim 1 that activity inhibitor is a polypeptide thru/or protein.

[Claim 5] The synthetic approach of claim 1 that the activity inhibitor is a nucleic acid.

[Claim 6] The synthetic approach of claim 1 that activation control of the activity inhibitor is what is depended on use of the inhibitor of the activity inhibitor.

[Claim 7] The synthetic approach of claim 6 which is the antibody to which an inhibitor neutralizes the activity inhibitor.

[Claim 8] The synthetic approach of claim 1 that activation control of the activity inhibitor is what is depended on removal of the activity inhibitor.

[Claim 9] The constituent for protein synthesis which does not contain the cell which comes to remove the activity inhibitor which is a factor which is activity inhibitor induced in connection with cytolysis in the constituent using the protein synthesis ability which it was obtained and the destroyed cell had for protein synthesis, and checks the activity of nucleic acid biosynthesis and/or protein synthesis by cytolysis from the constituent for protein synthesis, or comes to control the activation in the constituent for protein synthesis.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-203984

(43) 公開日 平成7年(1995)8月8日

(51) Int.Cl.⁶
C 1 2 P 21/00

識別記号 庁内整理番号
A 9282-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平6-7131

(22) 出願日 平成6年(1994)1月26日

(71) 出願人 594016182

遠藤 弥重太

愛媛県松山市朝美1丁目5番3号

(71) 出願人 000000044

旭硝子株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目1番2号

(72) 発明者 遠藤 弥重太

愛媛県松山市石手4丁目3番42号

(72) 発明者 吉成 茂夫

愛媛県松山市桑原2丁目9番8号

(72) 発明者 大場 優孝

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 泉名 謙治

(54) 【発明の名称】 蛋白質の合成方法

(57) 【要約】

【目的】蛋白質合成量を高めた無細胞蛋白質合成系による蛋白質合成方法を提供する。

【構成】細胞破壊に伴って誘発される活性阻害因子であって、かつ核酸合成および／または蛋白質合成の活性を阻害する因子である活性阻害因子の活性化を抑制し、細胞を含まない蛋白質合成系で遺伝子情報より蛋白質を合成する。

(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】細胞破壊に伴って誘発される活性阻害因子であって、核酸合成および／または蛋白質合成の活性を阻害する因子である活性阻害因子の活性化を抑制した無細胞蛋白質合成系で遺伝子情報より蛋白質を合成することを特徴とする、蛋白質の合成方法。

【請求項 2】細胞を含まない蛋白質合成系が細胞を破壊して得られる蛋白質合成系である、請求項 1 の合成方法。

【請求項 3】細胞が、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、または細菌細胞である、請求項 2 の合成方法。

【請求項 4】活性阻害因子がポリペプチドないし蛋白質である、請求項 1 の合成方法。

【請求項 5】活性阻害因子が核酸である、請求項 1 の合成方法。

【請求項 6】活性阻害因子の活性化抑制が、活性阻害因子の阻害剤の使用によるものである、請求項 1 の合成方法。

【請求項 7】阻害剤が活性阻害因子を中和する抗体である、請求項 6 の合成方法。

【請求項 8】活性阻害因子の活性化抑制が、活性阻害因子の除去によるものである、請求項 1 の合成方法。

【請求項 9】細胞破壊によって得られ、破壊された細胞が有していた蛋白質合成能を利用する蛋白質合成用の組成物において、細胞破壊に伴って誘発される活性阻害因子であって、核酸合成および／または蛋白質合成の活性を阻害する因子である活性阻害因子を蛋白質合成用組成物から除去してなるか蛋白質合成用組成物中でその活性化を抑制してなる、細胞を含まない蛋白質合成用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、核酸（DNAあるいはRNA）を鋳型とする、遺伝子情報から細胞を含まない蛋白質合成系で蛋白質を合成する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】ニレンバーグ（Nirenberg）らによって開発された、大腸菌抽出液を利用する無細胞蛋白質合成系（Nirenberg, M. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47, 1588-1602 (1961)）は、蛋白質合成機構の解明に大きな役割を果たした。その後、翻訳効率の高い無細胞蛋白質合成系が、大腸菌の他にも、コムギ胚芽やウサギ網状赤血球等からも調製され、現在では遺伝子翻訳産物の同定などに、広く利用されるようになった（Wu, R., et al., (ed) Methods in Enzymology, vol. 101, P. 598, P. 616, P. 629, P. 635, P. 644, P. 650, P. 674, P. 690, Academic Press, New York (1983)）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上記の無細胞

2

蛋白質合成系における蛋白質合成量は、生細胞に比べると百分の一から一万分の一と極端に低いことから、蛋白質の調製法としては利用できないという欠点がある。

【0004】最近、旧ソ連のスピリン（Spirin）らは、無細胞蛋白質合成系の効率化を目指して、連続式無細胞蛋白質合成システム（Continuous Flow Cell-Free Translation System）を開発した（Spirin, A. S., et al., Science, 242, 1162-1164 (1988)）。このシステムが従来の無細胞蛋白質合成系と異なる点は、合成反応で消費されるアミノ酸やエネルギー源などの基質を反応槽へ連続的に供給する一方、翻訳産物は系から取り出すというものである。しかし彼らのシステムも、蛋白質合成反応系としては、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球、あるいは大腸菌等から従来通りの方法で調製した翻訳活性の低い細胞抽出液を利用するものであることから、大幅な蛋白質合成効率の改良は望めない。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、従来の技術では注目されておらず不可避であった細胞破壊に伴って活性化される、核酸合成および／または蛋白質合成の活性阻害因子の活性化を抑制することにより、従来より効率の良い無細胞蛋白質合成系を調製することができることを見出した。本発明はこの知見に基づく下記の発明であり、またその蛋白質合成系（蛋白質合成用組成物）の発明である。

【0006】細胞破壊に伴って誘発される、核酸合成および／または蛋白質合成の活性阻害因子の活性化を抑制した細胞を含まない蛋白質合成系で遺伝子情報より蛋白質を合成することを特徴とする、蛋白質の合成方法。

【0007】本発明における核酸合成および／または蛋白質合成の活性阻害因子とは、細胞破壊に伴って誘発される因子であり、その因子は通常ポリペプチドないし蛋白質からなる酵素であり、また核酸の場合もある。この活性阻害因子は細胞破壊に伴うプログラム細胞死機構の作動によって誘発されるものであり、元々生物が個体あるいは集団の生存を可能にするために個々の細胞が持っている因子であると考えられる。この因子が活性化されると、例えば転写活性や翻訳活性などが阻害されることにより核酸合成および／または蛋白質合成の活性化が阻害されると考えられる。

【0008】この活性阻害因子は、通常種々のポリペプチドないし蛋白質からなる酵素であり、具体的な例としては、リボソーム活性を阻害するリボソーム不活性化蛋白質、リボヌクレアーゼ、リボヌクレオチドホスホリラーゼなどが挙げられる。上記活性阻害因子の活性化を抑制する手段としては、それを蛋白質合成系から除去することは勿論、蛋白質合成系内でその活性化を阻害する手段を採用することができる。特に、蛋白質合成系からこの活性阻害因子を選択的に除去することが困難な場合が少なくないことより、その活性化を阻害する手段、特に

(3)

3

特異的阻害剤を使用する手段、を採用することが好ましい。

【0009】上記活性阻害因子の特異的阻害剤としては、この活性阻害因子に特異的に結合しその活性を抑制する抗体が好ましい。この中和抗体は活性阻害因子の酵素活性を中和することにより、活性阻害因子の活性化を阻害すると考えられる。抗体としては、ポリクローナル抗体は勿論、モノクローナル抗体であってもよい。上記活性阻害因子の特異的阻害剤としてはこれら抗体に限られず、抗生物質などの種々の薬剤（蛋白質阻害剤、核酸系阻害剤など）であってもよい。これら阻害剤は抗体を含め2種以上併用することができる。

【0010】抗体などの上記活性阻害因子に特異的に結合し得る物質はまた蛋白質合成系からこの活性阻害因子を選択的に除去する方法に使用することもできる。例えば、特異的に結合し得る物質を適当な高分子物質に固定化し、この固定化担体共存下に蛋白質合成系を接触させて活性阻害因子を蛋白質合成系から除去することができる。

【0011】本発明における蛋白質合成系は実質的に生きた細胞を含まないいわゆる無細胞蛋白質合成系である。この蛋白質合成系は細胞破壊によって得られ、破壊された細胞が有していた蛋白質合成能を利用するものである。蛋白質合成系は細胞破壊液そのものであってもよいが、粗大固形分を除くなどの調製を行ったものが好ましい。通常は不要成分を除いた細胞抽出液に必要により成分を追加して調製される。

【0012】無細胞蛋白質合成系を調製するための起源の細胞（破壊する細胞）は特に限定されず、有核生物、原核生物のいずれの細胞も使用できる。すなわち、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、細菌細胞などが使用できる。具体的には、例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞、高等植物細胞、酵母細胞、放線菌細胞、大腸菌細胞などがある。

【0013】本発明の無細胞蛋白質合成系による蛋白質の合成は、前記活性阻害因子の不活性化～除去した無細胞蛋白質合成系である点を除き従来と同様の方法で行うことができる。この方法は周知～公知のバッチ法であってもよく、前記したスピリンらの連続式無細胞蛋白質合成システムなどの連続法であってもよい。

【0014】本発明について、コムギ胚芽の系を用いて行った実験により、具体例をもってさらに説明する。

【0015】発明者らは先に、ヒマ種子に存在する細胞毒素蛋白質であるライシン (ricin) の毒性機構を分子レベルで解明した (Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 5908-5912, Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 8128-8130)。すなわち、ライシンA鎖は、リボソーム大亜粒子を構成する大RNA分子（高等生物では26-28SrRNA、大腸菌では23SrRNAにあたる）の進化的にその構造が保存された特定部位のN-

4

グリコシド結合（ネズミ肝臓の28rRNAでは5'末端から4324番目）の加水分解を触媒する特異な酵素で、RNA N-グリコシダーゼ (RNA N-glycosidase) と命名した。リボソームは、この酵素活性によってアデニン1分子を遊離し、その翻訳機能を完全に消失することになる。

【0016】その後、ライシンA鎖と同一な活性を持ったリボソーム不活性化蛋白質 (Ribosome-Inactivating-Protein、以下RIPと略す) が多数の植物から単離された (Soria, M.R., et al., in Genetically Engineered Toxins (ed. by Frankel, A.E.), pp. 193-212, Marcel Dekker, Inc. (1992))。また、これらRIPの多くは、抗ウイルス作用を有することから、植物の自己防御機構に参与しているものと考えられているが、その実体に関しては不明の点が多い。

【0017】約30年前にニレンバーグらが、大腸菌から無細胞蛋白質合成系を開発して以来、種々の生物から無細胞蛋白質合成系が調製されている (Miller, J.S., et al., in Methods in Enzymology, part C, 101, pp. 650-674, Academic Press (1983))。なかでも、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球、または大腸菌などから調製された無細胞蛋白質合成系は比較的蛋白質合成活性が高く、現在ではそれらのキットも市販されている。しかしいずれの系においても、翻訳反応は1~2時間で停止し翻訳効率が極めて低いことから、蛋白質の実用的な調製手段としては利用できないという欠点を有する。

【0018】一般的に無細胞蛋白質合成系における蛋白質の合成量は生細胞のそれに比べて百分の一から一万分の一と見積もられているが (Manchester, K.L., in Mammalian Protein Metabolism, ed. by Munro, H.N., et al., IV, pp. 229-298, Academic Press (1970)) その原因については不明であった。発明者はまず、コムギ胚芽無細胞系における蛋白質合成活性低下の機作について調べることから無細胞蛋白質合成系の高効率の方策を検討した。

【0019】コムギ胚芽にはトリチン (trititin) と呼ばれるRIPが存在し、そのRNA N-グリコシダーゼ活性は、植物細胞リボソームをライシンA鎖と同一の機構でこれを不活性化することが知られている (Roberts, W. K., Biochemistry (1979), 18, 2615-2621)。発明者らはこれまでの研究結果から、コムギ胚芽無細胞系における低い翻訳活性は、この内因性トリチンによる自己リボソームの不活性化に起因するのではないかと考えた。そこで、コムギ胚芽の無細胞蛋白質を調製し、細胞破壊に伴うトリチンの活性化、コムギ胚芽リボソームの不活性化を調べたところ、コムギ胚芽リボソームの28SrRNAのN-グリコシダーゼ特異的作用部位の脱アデニンが観察され、さらにそのN-グリコシダーゼがトリチンであることを抗体を用いて同定した。

【0020】次に、上記の条件でトリチン抗体を共存させてコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系の蛋白質合成効率を

(4)

5

調べた。mRNAとしてジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を用い、 ^{14}C -ロイシンの取り込みを測定したところ、抗体添加系では無添加系に比べ反応時間が少なくとも1.5倍以上も延び、取り込み量も2.5倍以上であった。

【0021】以上のことをまとめると、(1)コムギ胚芽に内存するプログラム細胞死機構に関わるトリチンが、コムギ胚芽の破碎に伴って不可避的に細胞抽出液に混入し、自己のリボソームを不活性化すること、(2)無細胞系における蛋白質合成の低下はこのことに起因すること、(3)抗トリチン抗体を用いるなど、トリチン活性を除去・中和することによって長時間にわたって蛋白質合成反応が持続するようになるので蛋白質合成活性の効率化ができることなどが示された。

【0022】以上説明した実験について、以下実施例として具体的に説明する。しかし、本発明はこの実施例のみに限定されるものではない。

【0023】

【実施例】

〔実施例1〕

コムギ胚芽の破碎によって誘発されるトリチンの活性化および、コムギ胚芽リボソームの不活性化

【0024】市販のコムギ胚芽をエリクソン(Erickson)の方法で破碎し、細胞抽出液を得た後、無細胞蛋白質合成液を調製した(Erickson, A.H., et al., in Methods in Enzymology(1983), 96, 38-50)。ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)をコードするmRNAを鋳型として用い、上記エリクソンらの方法に従って26℃で蛋白質合成反応を行った。コムギ胚芽リボソームの内因性RNA N-グリコシダーゼによる脱アデニン化反応は発明者らの方法によって調べた(Endo, Y., et al., J. Biol. Chem. (1987), 262, 5908-5912)。

【0025】反応2、4、6時間後の反応液からそれぞれRNAを抽出し、酸性下アニリン処理を行った後、ゲル電気泳動で、28 rRNAを分離すると、図1の矢印部に新たなRNA断片が生じていることが認められた(それぞれレーン3、4、5の矢印部)。RNA断片の生成は、保温開始前には見られない(レーン1)。このRNA断片は、別に作成しておいたRNA断片マーカー(レーン2)と同一の移動度を示すことから、コムギ胚芽リボソームの28 S rRNAの脱アデニン部は、進化的にその構造が保存されたRNA N-グリコシダーゼの特異的な作用部位(ネズミ肝28 rRNAの4324番目のアデニンに対応)であることが判明した。

【0026】以上の結果は、コムギ胚芽の破碎に伴って、内因性のRNA N-グリコシダーゼが何らかの機作によって活性化したことを示している。さらに、この結果は、コムギ胚芽無細胞系においては、蛋白質合成反応中にこのRIPの作用によって、リボソームの不活性が生じることを示唆している。

6

【0027】次に、このRNA N-グリコシダーゼの蛋白質としての実体がトリチンであるか否かを調べる目的で、家兎にて作製したトリチン抗体を用いて、上記RNA N-グリコシダーゼの中和実験を試みた。上記と同様な蛋白質合成系にトリチン抗体を添加して6時間反応を行い、同様にRNAをゲル電気泳動で分解した。

【0028】その結果、トリチン抗体の添加によって、RNA断片の生成が著しく抑制されることが確認された(図1、レーン5とレーン6の矢印部のバンドの濃さを比較するとレーン6が著しく薄くなった)。この事実は、コムギ胚芽リボソームの修飾反応(脱アデニン化)が、内因性のRIPであるトリチンによって触媒されたことを示している。さらにこの結果は、生理機能が不明であったコムギ胚芽トリチンが、傷ついた胚芽細胞のリボソームを不活性化し、みずから自殺することによって、ウイルス感染などを防ぐ、いわゆるプログラム細胞死機構の因子として働いていることを示している。

【0029】また本実験結果は、細胞破碎によって起因されたトリチンの活性を、同蛋白質に対する抗体を用いることによって有効に中和することが可能なことも示している。しかし、この翻訳反応系へ抗体を添加する方法による中和は完全でないことが分かる(レーン6で若干の特異バンドが生成することで分かる)。そこで、トリチン活性を除去することを目的に、コムギ胚芽抽出液の調製は、以下の2方法を併用した。すなわち、(1)抽出液は、トリチン抗体存在下に調製する、(2)トリチン抗体を固定化したカラムに抽出液を通し、内存性トリチンを補集除去することである。

【0030】このようにして得たコムギ胚芽抽出液を用いて、上記と同様に蛋白質合成反応を行い、RNAを分析した結果を図1のレーン7に示した。写真から分かるように、6時間の反応において、特異なRNA断片がほとんど生成しない(レーン7の矢印部分にはほとんど特異バンドが見られない)。レーン6、7に対応する対照実験を非免疫抗体を用いると(レーン8、9)、レーン5で見られたと同様に、リボソームの顕著な脱アデニン化反応が認められる。

【0031】〔実施例2〕トリチン抗体を利用した、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成系の効率化

【0032】RNA N-グリコシダーゼの作用によって脱アデニン化したリボソームは、mRNA上でフリーズし、ペプチド鎖伸長反応が停止することが知られている。(Furutani, M., et al., Arch. Biochem. Biophys. (1992), 293, 140-146)。そこで、上記実施例1で示した条件下で、DHFR合成を ^{14}C -ロイシンの蛋白質への取り込みから測定した。実験方法は、エリクソン, A.H.らの常法を用いた。その結果を図2に示す。

【0033】図2に示したように、従来のコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系では、鋳型mRNAの添加に依存して翻訳反応が進行するが、2時間後には、反応が完全に停

(5)

止する(●—●)。同様な反応液にトリチン抗体を添加すると、翻訳反応が約3時間まではほぼ直線的に進行し、さらにその後も反応が持続することが分かる(□—□)。さらに、内存性トリチンを除去し、反応時にトリチン抗体を添加した反応系では、翻訳反応が5時間以上にわたって、ほぼ直線的に進行することが明らかになった(△—△)。これと同様な実験を非トリチン抗体存在下で行っても、その効果は全く認められない(■—■)。なお、鋳型mRNAの添加を行わない場合は、蛋白質合成は行われない(○—○)。

【0034】これらの結果は、抗トリチン抗体がコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系における蛋白質合成の効率を著しく上昇させることを示している。図2の¹⁴C—ロイシンの取り込み放射活性から、DHFRの反応系1ml当たりの合成量を計算すると、従来の無細胞系では最大限で約40μgであるのに対し、トリチン抗体を利用して、内存性トリチンを除去・中和した系では約105μgであった。この収量は、スピリンらの開発した連続式無細胞蛋白質合成システムを利用する蛋白質合成量[反応液1ml, 反応時間20時間当たり97μg] (Endo, Y., et al., J. Biotechnology (1992), 25, 221-230) に匹敵するものであった。

【0035】[実施例3]
翻訳産物の同定

【0036】図2では、¹⁴C—ロイシンの蛋白質への取り込みを測定したが、実際に目的とする完成されたDHFRが、合成されていることを確認する目的で、6時間の反応後、反応液の一部(2.5μl)を採り、蛋白質SDS—ゲル電気泳動によって分離し、蛋白質のバンドをクマシーブリリアントブルーを用いて染色した(図3)。

【0037】レーン1はDHFR mRNA非存在下、レ

ーン2はその存在下で蛋白質合成を行ったものである。レーン3はトリチン抗体を反応系に添加したもの、レーン4はトリチンをトリチン抗体を利用して、除去・中和した反応液を分析したものである。レーン4の矢印部にDHFRと同一の移動度を示す蛋白質バンドが明確に認められる。また、対応するバンドがレーン1には確認できないことから、これがDHFR mRNAの翻訳産物であると結論した。従来のコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系では、生成量が少ないことからDHFRは明瞭なバンドとしては観察されない。

【0038】さらにレーン4とレーン3のデンストメーターを用いたDHFRバンドのスキニングの結果から、既に発明者らは、従来の無細胞系を用いてDHFR合成を試み、この翻訳産物が酵素活性を保持していることを見出している (Endo, Y., et al., J. Biotechnology (1992), 25, 221-230) ので、本実験で合成されたDHFRも酵素活性を有する蛋白質としての構造を保持しているものと考えられる。

【0039】

【発明の効果】本発明は従来1~2時間程度で反応の進行が止まってしまった無細胞蛋白質合成系の寿命を3~5時間以上に延ばすばかりか、反応効率も上昇させるという優れた効果を有し、特に生成蛋白量が従来の系の2.5倍以上にも達することにより、蛋白質製造コストの低減に大きく寄与する効果が認められる。またスピリンらの開発した連続式蛋白合成系と組み合わせることにより、さらなる効率化が期待できる。

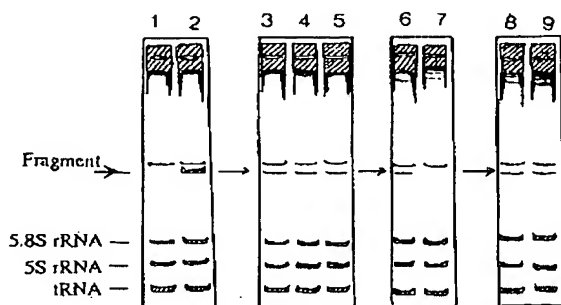
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の実験結果を示す電気泳動図

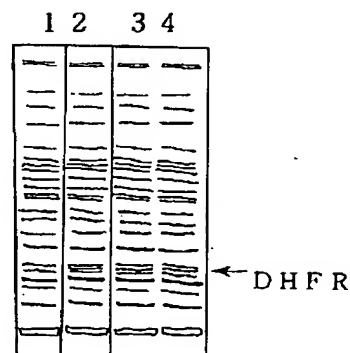
【図2】実施例2の実験結果を示すグラフ

【図3】実施例3の実験結果を示す電気泳動図

【図1】



【図3】



(6)

【図2】

